

PRODUCTION OF TAXANE-TYPE DITERPENE

Patent Number: JP8163991
Publication date: 1996-06-25
Inventor(s): YUKIMUNE TAKAHITO;; HARA YASUHIRO
Applicant(s): MITSUI PETROCHEM IND LTD
Requested Patent: ☐ JP8163991
Application Number: JP19940312258 19941215
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P13/02
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain a taxane-type diterpene compound useful for a medicine, etc., of ovarian cancer, breast cancer and lung cancer, etc., in a high productivity by culturing tissue or cell, etc., of a plant producing a taxane-type diterpene in a medium containing fatty acids and recovering a product from the resultant cultured material.

CONSTITUTION: A tissue and/or cell of a plant (e.g. *Taxus brevifolia* NUTT) producing taxane-type diterpene (e.g. taxol, et.) is cultured in a medium containing 10-22C fatty acids such as oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid, capric acid, decenoic acid, lauric acid, dodecenoic acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid in a concentration of 0.01-1000 μ M. The object taxane-type diterpene useful for a remedy of ovarian cancer, breast cancer and lung cancer, etc., is obtained in a high productivity by recovering the taxane-type diterpene from the resultant cultured material.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-163991

(43)公開日 平成8年(1996)6月25日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 13/02		2121-4B		
// A 6 1 K 31/21	ADU	9455-4C		
31/335				
(C 1 2 P 13/02				
C 1 2 R 1:91)				

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平6-312258

(22)出願日 平成6年(1994)12月15日

(71)出願人 000005887

三井石油化学工業株式会社
東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72)発明者 行宗 敬人

山口県玖珂郡和木町和木六丁目1番2号
三井石油化学工業株式会社内

(72)発明者 原 康弘

山口県玖珂郡和木町和木六丁目1番2号
三井石油化学工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】 タキサン型ジテルペンの製造方法

(57)【要約】

【構成】 タキサン型ジテルペンを産生する植物の組織または細胞を特定の脂肪酸および/またはその誘導体を含む培地で培養し、得られる培養物および/または培地からタキサン型ジテルペンを回収することを特徴とするタキサン型ジテルペンの製造方法。

【効果】 本発明の方法は、タキサン型ジテルペンの生産性の向上を可能にする。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 タキサン型ジテルペンを産生する植物の組織および／または細胞を脂肪酸類を含む培地で培養し、得られる培養物からタキサン型ジテルペンを回収することを特徴とするタキサン型ジテルペンの製造方法。

【請求項2】 脂肪酸類が、主鎖の炭素数が10～22の直鎖飽和脂肪酸または直鎖不飽和脂肪酸であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 脂肪酸類が、主鎖の炭素数が10～22であって、かつ置換基として、炭素数1～6の炭化水素基、水酸基、アミノ基から選ばれる少なくとも1種以上を、1個または2個以上有する脂肪酸であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】 脂肪酸類が、主鎖の炭素数が10～22であって、主鎖中に1個または2個以上のシス型二重結合を含む不飽和脂肪酸であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】 脂肪酸類が、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸から選ばれる少なくとも1種以上であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項6】 脂肪酸類が、カプリン酸、デセン酸、ラウリン酸、ドデセン酸、ミリスチン酸、ミリストオレイン酸、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、ステアリン酸、バクセン酸、テトラオクタデセン酸、アラキン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサヘキサエン酸から選ばれる少なくとも1種以上であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項7】 脂肪酸類が、下記の一般式(I)

【化1】



【式中、 $R^1 - CO$ は請求項1～請求項6に記載の脂肪酸に由来する原子団を表し； R^2 は、 OR^3 （ここで R^3 は、炭素数1～6のアルキル基または炭水化物残基を表す）、 OM （ここで M はアルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子または NH_4 を表す）、または $NR^{4a}R^{4b}$ （ここで、 R^{4a} 、 R^{4b} は、それぞれ独立に水素原子、炭素数1～6のアルキル基、アミノ酸残基を表す）を表す】で示される脂肪酸誘導体であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項8】 脂肪酸類の培地への添加濃度が、0.01～1000 μM であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項9】 脂肪酸類の培地への添加濃度が、0.1～500 μM であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項10】 タキサン型ジテルペンを産生する植物がイチイ属植物であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項11】 タキサン型ジテルペンを産生する植物が*Taxus baccata*であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項12】 タキサン型ジテルペンを産生する植物が*Taxus media*であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項13】 タキサン型ジテルペンが、タキソール、10-デアセチルタキソール、7-エピタキソール、パッカチンIII、10-デアセチルパッカチンIII、7-エピパッカチンIII、セファロマニン、10-デアセチルセファロマニン、7-エピセファロマニン、タキサギフィン及びその類縁体、タキサン1a及びその類縁体、キシロシルセファロマニン、及びキシロシルタキソールよりなる群から選ばれる少なくとも1種類以上であることを特徴とする請求項1に記載のタキサン型ジテルペンの製造方法。

【請求項14】 タキサン型ジテルペンを産生する植物の組織および／または細胞を、培地容量に対して1～1000mg/lの植物性天然油を含む培地で培養し、得られる培養物からタキサン型ジテルペンを回収することを特徴とするタキサン型ジテルペンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、卵巣癌、乳癌、肺癌等の治療薬として有用であるタキソールを含むタキサン型ジテルペンの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】卵巣癌、乳癌、肺癌等の治療薬として有用であるタキソール(Taxol)は、イチイ科イチイ属植物であるタイヘイヨウイチイ(*Taxus brevifolia* NUTT)より単離同定されたタキサン型ジテルペンであり、活性と関連する複雑なエステルグループを有している。タキソールはタイヘイヨウイチイ植物体中のどの部位にも存在し、その含量は樹皮で最も高いことが報告されている。現在、タキソールは天然のまたは栽培された植物体中から採取されているが、イチイ属植物は地上20cmの高さに生長するのに10年以上かかる生育の遅い植物であり、また樹皮を剥ぐと木が枯れてしまうことから容易に大量のタキソールを得ることは困難である。もし、タキソールまたはタキソールの前駆物質であるパッカチンIII等のタキサン型ジテルペンを組織培養を利用して生産することができれば、樹木を伐採する事なく、大量のタキソールを容易に得ることができるので有利である。

【0003】これまでの植物の培養細胞を利用したタキソール生産方法については、タイヘイヨウイチイ(*Taxus brevifolia* NUTT)培養細胞によるタキソール生産が米国で特許(US Patent:5019504)になっているが、そのタキソール生産量は1～3mg/lと記載されており、工業的生産には不十分である。また、細胞培養によるタキソールの生産性は不安定であり、選抜で一時的に生産性の高い細胞が得られても、継代培養してその含量を維持することは難しい(B.R.M.Wickremesine et al., World Congress on Cell and Tissue Culture(1992))。

【0004】また、タキソール生産法の先行技術としては、タキソール生成前駆体であるバッカチンIII(baccatin III)からの半合成法がHoltonらの米国特許に開示されている(US Patent:5015744)。植物の組織培養法を用いれば、バッカチンIII等の半合成原料の生産も可能であり、本法によるタキソール生産にも有利である。

【0005】かかる状況下、植物組織培養においてタキサン型ジテルペンの生産性の向上が望まれるところである。

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、植物組織培養により、効率よくタキサン型ジテルペンを製造する方法を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、タキサン型ジテルペンを産生する植物の組織および/または細胞を培養するに当たって、脂肪酸類を培地に添加することによって、顕著にタキサン型ジテルペンの生産量が増加することを見だし、本発明を完成するに至った。

【0007】これまで、特定の二次代謝産物の生産性向上に脂肪酸類が効果を及ぼすことは全く報告されておらず、培地への脂肪酸類の添加によって、タキサン型ジテルペンの生産性が向上することは予想外のことであった。

【0008】すなわち、本発明はタキサン型ジテルペンを産生する植物の組織および/または細胞を、特定の脂肪酸類および/または植物性天然油を含む培地で培養し、得られる培養物および/または培地からタキサン型ジテルペンを回収することを特徴とするタキサン型ジテルペンの製造方法に関する。

【0009】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の製造方法の対象となるタキサン型ジテルペンとしては、タキサン骨格を有するジテルペンであれば特に制限はなく、例えばタキソール、10-デアセチルタキソール、7-エピタキソール、バッカチンIII、10-デアセチルバッカチンIII、7-エピバッカチンIII、セファロマニン、10-デアセチルセファロマニン、7-エピセファロマニン、タキサギフィンおよびその類縁体、タキサン1aおよびその類縁体、キシロシルセファロマニン、キシロシルタキソール等が挙げられる。

【0010】本発明の組織培養に用いられるタキサン型ジテルペンを産生する植物としては、例えばセイヨウイチイ(*Taxus baccata* LINN)、イチイ(*T. cuspidata* SIEB. et ZUCC)、キャラボク(*T. cuspidata* SIEB. et ZUCC var. *nana* REHDER)、タイヘイヨウイチイ(*T. brevifolia* NUTT)、カナダイイチイ(*T. canadensis* MARSH)、中国イチイ(*T. chinensis*)、*T. media*等のイチイ属植物を挙げることができる。本発明では、これらの中でもセイヨウイチイおよび*T. media*が特に好ましい。

【0011】前記植物組織または細胞の培養は、本発明

により、特定の脂肪酸類を含む培地で培養すること以外は、従来から知られている方法によって行うことができる。

【0012】本発明に使用する脂肪酸類としては、主鎖の炭素数が10~22の合成または天然脂肪酸を例示することができ、これらの中でも、主鎖の炭素数が偶数の脂肪酸が好ましい。これらの脂肪酸は飽和であってもよいし、また炭素鎖中に1個または2個以上の二重結合を含む不飽和脂肪酸であってもよい。また、炭素鎖に結合している水素原子のうち、1個または2個以上が炭素数1~6の炭化水素基、水酸基またはアミノ基に置換されていてもよい。さらに、当該不飽和脂肪酸に含まれる二重結合は、シス型、トランス型、また両者の混合でもかまわないが、シス型二重結合を含む脂肪酸が好ましい。

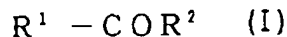
【0013】上記の脂肪酸の具体的な例としては、カプリン酸、デセン酸、ラウリン酸、ドデセン酸、ミリスチン酸、ミリストオレイン酸、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、テトラオクタデセン酸、アラキン酸、アラキドン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサヘキサエン酸などの直鎖脂肪酸、リシノール酸などのヒドロキシ脂肪酸、14-メチルパルミチン酸などの分岐脂肪酸を挙げることができ、これらの中でもオレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸が好ましく、特に α -リノレン酸が好ましい。

【0014】また、置換基のうち、炭素数1~6の炭化水素基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、シクロプロピル基、ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。また、置換基のうち、アミノ基としては、アミノ基、モノメチルアミノ基、ジメチルアミノ基などを例示することができる。

【0015】また、培地に添加する脂肪酸類は、下記の一般式(I)：

【0016】

【化2】



【0017】〔式中、 $R^1 - CO$ は前記の脂肪酸に由来する原子団を表し； R^2 は、 OR^3 （ここで R^3 は、炭素数1~6のアルキル基または炭水化物残基を表す）、 OM （ここで M はアルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子または NH_4 を表す）、または $NR^{4a}R^{4b}$ （ここで、 R^{4a} 、 R^{4b} は、それぞれ独立に水素原子、炭素数1~6のアルキル基、アミノ酸残基を表す）を表す。〕で示される脂肪酸誘導体であってもかまわない。

【0018】前記一般式(I)において、 R^3 、 R^{4a} 、 R^{4b} で表される炭素数1~6のアルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペ

ンチル基、*t*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、イソヘキシル基等が挙げられる。 R^2 がOMである場合において、Mで表されるアルカリ金属原子又はアルカリ土類金属原子としては、例えばナトリウム、カリウム、カルシウムが挙げられる。 R^2 が $NR^{4a}R^{4b}$ である場合において、 R^{4a} 、 R^{4b} で表されるアミノ酸残基としては、例えばグリシル基、ロイシル基、グルタミル基、リジル基、フェニルアラニル基、イソロイシル基、チロシル基、トリプトフィル基が挙げられる。 R^2 が OR^3 である場合において、 R^3 で表される炭水化物残基としては、例えば

グルコピラノシル基が挙げられる。
【0019】本発明に使用される脂肪酸および/またははその誘導体は、0.01~1000 μ Mの濃度範囲で培地に添加することが好ましく、さらに0.1~500 μ Mの濃度範囲で添加することが、タキサン型ジテルペンの生産性向上に対する効果の点で特に好ましい（ここで示した濃度範囲は、2種以上の脂肪酸および/または誘導体を組み合わせて使用する際には、合計の添加濃度を表す）。

【0020】また、本発明では、前記の脂肪酸類として、脂肪酸を含む天然油またはその酵素加水分解産物を使用することもできる。ここで、天然油としては、ナタネ油、ダイズ油、アマニ油、ペニバナ油などの植物油が例示され、酵素加水分解物としては、上記植物油のリパーゼ分解物などを例示することができる。また、当該天然油またはその酵素加水分解物の培地への添加濃度としては、1~1000mg/lが好ましい。

【0021】さらに、脂肪酸類を系外から添加するほかに、培地に脂質分解酵素を添加することによって、当該組織および/または細胞を構成するグリセロ脂質などの脂質を一部加水分解し、脂肪酸を培地に遊離させることも可能である。ここで、脂質分解酵素としては、リパーゼ、ホスホリパーゼA₁、ホスホリパーゼA₂、ホスホリパーゼBが例示され、特に酸性領域に至適pHを有するホスホリパーゼA₁、ホスホリパーゼA₂、ホスホリパーゼBが好ましい。また、本発明では、上記酵素の添加濃度は、培地容量当たり0.1~100mg/lが好ましい。

【0022】本発明では、以上の条件を満たす脂肪酸またはその誘導体、天然油、脂質分解酵素を単独で使用してもよいし、また、それぞれを任意に組み合わせて使用してもよい。

【0023】これらの脂肪酸またはその誘導体、天然油あるいは脂質分解酵素は、培養初期から培地に添加してもよいし、培養途中に添加してもよい。また、培養中任意の時期に一括して添加してもよいし、複数回に分けて添加してもよい。

【0024】また、上記の脂肪酸類および天然油の培地への添加方法としては、エタノールなどの有機溶媒に溶解させて添加する方法、オクチル- β -D-グルコシドなどの界面活性剤とともに添加する方法、あるいは培地にそのまま添加した後、超音波処理などによってミセル

化する方法などが例示できる。また、培地にそのまま添加し、油水分離した状態で培養を実施することも可能である。

【0025】本発明の組織培養に使用される培地としては、従来から知られている植物の組織培養に用いられる培地、例えばムラシゲ・スクーグ(1962年) [Murashige & Skoog] の培地、リンスマイヤー・スクーグ(1965年) [Linsmaier Skoog] の培地、ウッディー・プラント・メディウム(1981年) [Woody Plant] の培地、ガンボルグ [Gamborg] のB-5培地、三井のM-9培地等が挙げられる。

【0026】これら培地に植物ホルモンを添加し、更に必要に応じて炭素源、無機成分、ビタミン類、アミノ酸等を添加することもできる。

【0027】炭素源としては、グルコース、フルクトースなどの単糖類、シュクロース、マルトースなどの二糖類、またはデンプンなどの多糖類を使用することができる。

【0028】無機成分としては、例えば硝酸塩および/またはアンモニウム塩などの窒素源、リン、カリウム、カルシウム、マグネシウム、イオウ、鉄、マンガン、亜鉛、ホウ素、銅、モリブデン、塩素、ナトリウム、ヨウ素、コバルト等があげられ、これらの成分は例えば硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸カルシウム、塩化カリウム、リン酸1水素カリウム、リン酸2水素カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸第二鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、ホウ酸、硫酸銅、モリブデン酸ナトリウム、三酸化モリブデン、ヨウ化カリウム、塩化コバルト等の化合物として添加できる。

【0029】植物ホルモンとしては、例えばインドール酢酸(IAA)、ナフタレン酢酸(NAA)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)等のオーキシニン類、カイネチン、ゼアチン、ジヒドロゼアチン等のサイトカイニン類が用いられる。

【0030】ビタミン類としては、例えばビオチン、チアミン(ビタミンB₁)、ピリドキシン(ビタミンB₆)、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等が用いられる。

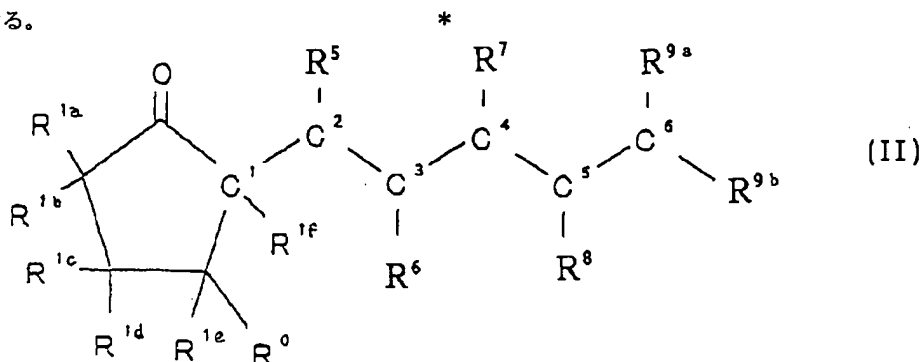
【0031】アミノ酸類としては、例えばグリシン、フェニルアラニン、ロイシン、グルタミン、システイン等を添加できる。

【0032】一般に前記の各成分は、炭素源が約1~約30g/l、無機成分が約0.1 μ M~100mM、植物ホルモン類が約0.01~約10 μ M、ビタミン類およびアミノ酸類がそれぞれ約0.1~約100mg/lの濃度で用いられる。

【0033】なお、本発明は液体培地および寒天やゲランガム等を通常0.1~1%含有する固形培地のいずれにも使用できるが、液体培地を用いる方がより効果的である。

【0034】本発明の組織培養においては、上記植物の根、生長点、葉、茎、種子、花粉、葯、がく等の組織片または細胞、あるいはこれらを上記培地あるいは他の従来の培地によって組織培養して得られる培養細胞を使用することができる。

【0035】また本発明は、*Agrobacterium tumefaciens* あるいは *Agrobacterium rhizogenes* を植物組織に感染することによって得られる腫瘍細胞および/または毛状根にも使用できる。



【0038】【式中、R⁰ は次式：

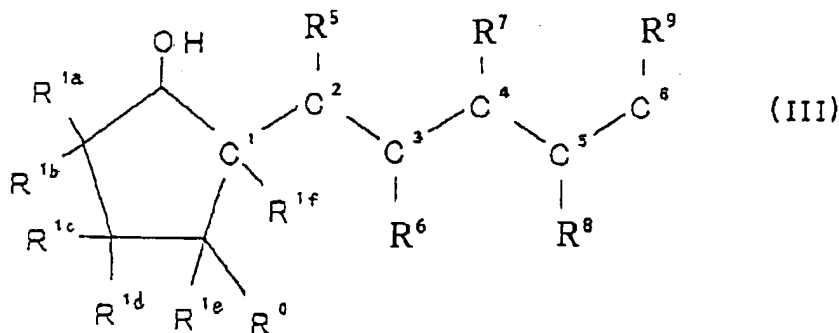


【式中、R¹⁰ は水酸基、OM'（ここで、M' はアルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子又はNH₄を表す。）、NR^{11a} R^{11b}（ここで、R^{11a}、R^{11b}は、それぞれ独立に水素原子、炭素数1～6のアシル基、炭素数1～6のアルキル基又はアミノ酸残基を表す。）、OR¹²（ここで、R¹²は、炭素数1～6のアルキル基又は炭水化物残基を表す。）又は炭素数1～6のアルキル基を表し、nは1～7の整数を表す。】で示される基を表し；R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、R^{1d}、R^{1e}及びR^{1f}は、それぞれ

※それぞれ水素原子、水酸基、炭素数1～6のアルキル基、又は炭素数1～6のアルコキシ基を表し；R⁵、R⁶、R⁷、R⁸及びR^{9a}は、それぞれ水素原子又は炭素数1～6のアルキル基を表し；C¹ - C² - C³ - C⁴ - C⁵ - C⁶ からなる側鎖は、1個又は2個以上の二重結合を含んでいてもよく；R^{9b}は、水酸基又は-O-炭水化物残基を表し；前記5員環は隣接する環員炭素原子間で二重結合を形成してもよい。】で示される化合物、または一般式 (III)：

【0039】

【化4】



【0040】【式中、R⁰ は次式：

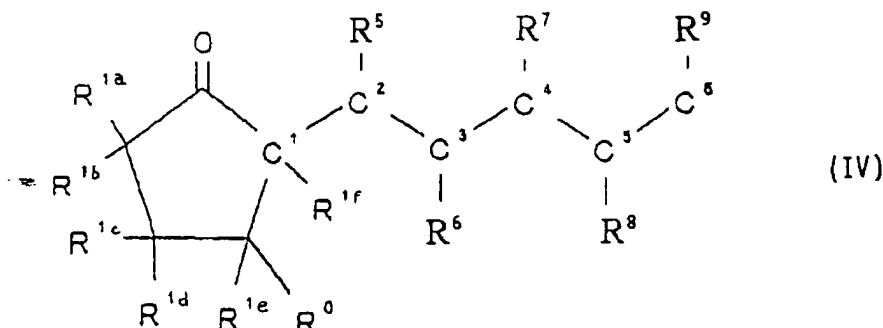


【式中、R¹⁰ は水酸基、OM'（ここで、M' はアルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子又はNH₄を表す。）、NR^{11a} R^{11b}（ここで、R^{11a}、R^{11b}は、それぞれ独立に水素原子、炭素数1～6のアシル基、炭素数1～6のアルキル基又はアミノ酸残基を表す。）、OR¹²（ここで、R¹²は、炭素数1～6のアルキル基又は炭水化物残基を表す。）又は炭素数1～6のアルキル基を表し、nは1～7の整数を表す。】で示される基を

表し；R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、R^{1d}、R^{1e}及びR^{1f}は、それぞれ水素原子、水酸基、炭素数1～6のアルキル基、又は炭素数1～6のアルコキシ基を表し；R⁵、R⁶、R⁷、R⁸及びR⁹は、それぞれ水素原子又は炭素数1～6のアルキル基を表し；C¹ - C² - C³ - C⁴ - C⁵ - C⁶ からなる側鎖は、1個又は2個以上の二重結合を含んでいてもよく；前記5員環は隣接する環員炭素原子間で二重結合を形成してもよい。】で示される化合物、又は一般式 (IV)：

【0041】

【化5】

【0042】【式中、R⁰ は次式：—(CH₂)_n、—CO—R¹⁰

【式中、R¹⁰は水酸基、OM'（ここで、M'はアルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子又はNH₄を表す。）、NR^{11a}、R^{11b}（ここで、R^{11a}、R^{11b}は、それぞれ独立に水素原子、炭素数1～6のアシル基、炭素数1～6のアルキル基又はアミノ酸残基を表す。）、OR¹²（ここで、R¹²は、炭素数1～6のアルキル基又は炭水化物残基を表す。）又は炭素数1～6のアルキル基を表し、nは1～7の整数を表す。】で示される基を表し；R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、R^{1d}、R^{1e}及びR^{1f}は、それぞれ水素原子、水酸基、炭素数1～6のアルキル基、又は炭素数1～6のアルコキシ基を表し；R⁵、R⁶、R⁷、R⁸及びR⁹は、それぞれ水素原子又は炭素数1～6のアルキル基を表し；C¹—C²—C³—C⁴—C⁵—C⁶からなる側鎖は、1個又は2個以上の二重結合を含んでいてもよく；前記5員環は隣接する環員炭素原子間で二重結合を形成してもよい。】で示される化合物等が挙げられる。

【0043】前記一般式(II)、(III)及び(IV)において、R⁰、R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、R^{1d}、R^{1e}、R^{1f}、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R^{9a}、R¹⁰、R^{11a}、R^{11b}、又はR¹²で表される炭素数1～6のアルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、t-ペンチル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基等が挙げられる。前記一般式(I)、(III)及び(IV)において、R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、R^{1d}、R^{1e}又はR^{1f}で表される炭素数1～6のアルコキシ基としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、イソブトキシ基、sec-ブトキシ基、t-ブトキシ基、n-ペンチルオキシ基、イソペンチルオキシ基、ネオペンチルオキシ基、t-ペンチルオキシ基、n-ヘキシルオキシ基、イソヘキシルオキシ基等が挙げられる。

【0044】R¹⁰がOM'である場合において、M'で表されるアルカリ金属原子又はアルカリ土類金属原子としては、例えばナトリウム、カリウム、カルシウムが挙

げられる。R¹⁰がNR^{11a}、R^{11b}である場合において、R^{11a}、R^{11b}で表される炭素数1～6のアシル基は、直鎖、分岐鎖のいずれでもよく、例えばホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、バレリル基、ヘキサノイル基、アクリロイル基等が挙げられる。

【0045】R¹⁰がNR^{11a}、R^{11b}である場合において、R^{11a}、R^{11b}で表されるアミノ酸残基としては、例えばイソロイシル基、チロシル基、トリプトフィル基が挙げられる。R¹⁰がOR¹²である場合において、R¹²で表される炭水化物残基としては、例えばグルコピラノシル基が挙げられる。前記一般式(II)において、R^{9a}が—O—炭水化物残基である場合における炭水化物残基としては、例えばグルコピラノシル基が挙げられる。

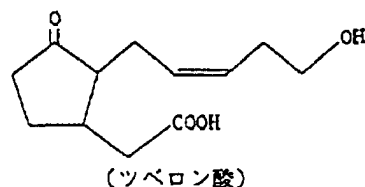
【0046】前記一般式(II)、(III)又は(IV)で示される化合物の好ましいものとしては、R⁰が—(CH₂)_n、COOH又は—(CH₂)_n、COOCH₃であり、R⁰、R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、R^{1d}、R^{1e}、R^{1f}、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R^{9a}、R⁹が、それぞれ水素原子を表すか、或いはC¹とC²、C³とC⁴、又はC⁵とC⁶の間で二重結合を含んでいる化合物が挙げられる。

【0047】前記一般式(II)で示されるジャスモン酸類の好ましい具体例としては、例えば、以下に示す化合物が挙げられる。

(化合物A)

【0048】

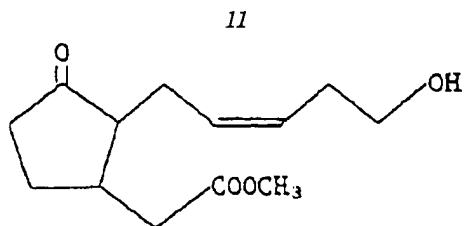
【化6】



【0049】(化合物B)

【0050】

【化7】

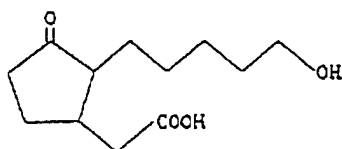


(ツベロン酸メチル)

【0051】 (化合物C)

【0052】

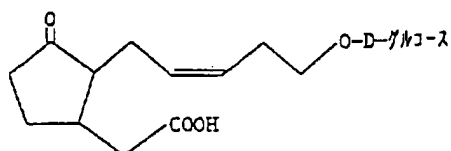
【化8】



【0053】 (化合物D)

【0054】

【化9】

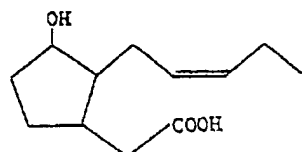


【0055】前記一般式 (III) で示されるジャスモン酸類の好ましい具体例としては、例えば、以下に示す化合物が挙げられる。

(化合物E)

【0056】

【化10】

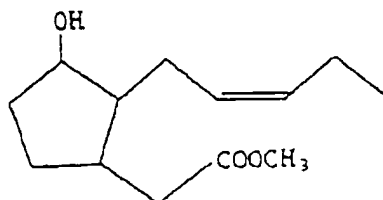


(ククルビン酸)

【0057】 (化合物F)

【0058】

【化11】



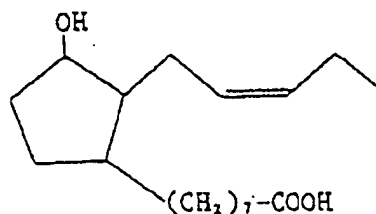
(ククルビン酸メチル)

【0059】 (化合物G)

【0060】

【化12】

12

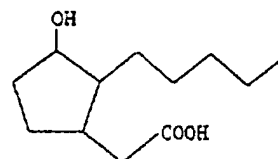


【0061】 (化合物H)

【0062】

【化13】

10



【0063】前記一般式 (IV) で示されるジャスモン酸類の好ましい具体例としては、例えば、以下に示す化合物が挙げられる。

(化合物I)

20 $R^0 : - (CH_2)_n, COOH$ 又は $- (CH_2)_n, COOCH_3$

(n=1~3)

$R^{1a}, R^{1b}, R^{1c}, R^{1d}, R^{1e}, R^{1f}, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 : H$

 $C^3 - C^4$ 間: 二重結合

(化合物J)

 $R^0 : -CH_2 COOH$

$R^{1a}, R^{1b}, R^{1c}, R^{1d}, R^{1e}, R^{1f}, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 : H$

30 また、前記一般式 (IV) で示される化合物は、5員環が、更に水酸基で置換されていてもよく、隣接する環員炭素原子間で二重結合を形成してもよい。

【0064】5員環が、更に水酸基で置換された化合物、又は隣接する環員炭素原子間で二重結合が形成された化合物の具体例としては、例えば、以下に示す化合物が挙げられる。

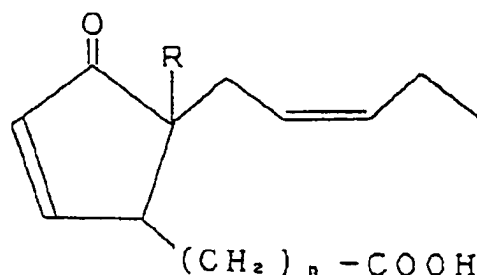
(化合物K)

【0065】

【化14】

40

13

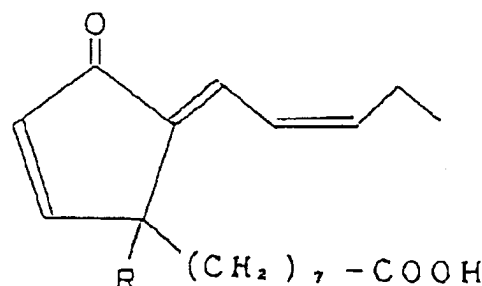


- (1) $n=1, R=H$
 (2) $n=7, R=H$
 (3) $n=7, R=OH$

【0066】(化合物L)

【0067】

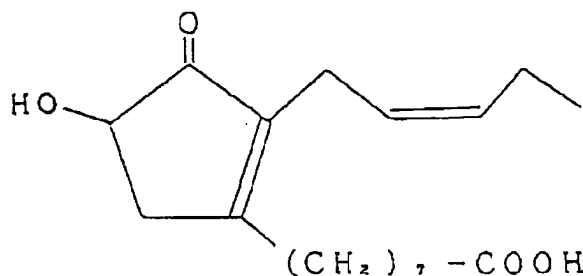
【化15】



- (1) $R=H$
 (2) $R=OH$

20

*



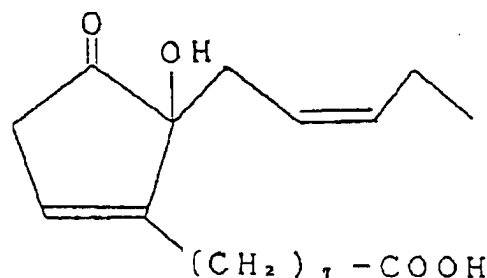
40

【0072】前記ジャスモン酸類には種々の立体異性体(シストランス異性体、光学異性体)が存在するが、それぞれの異性体を単独で用いても、混合物の形で用いてもよい。以上のジャスモン酸類は、全てタキサン型ジテルペンの生産性向上に効果を有するが、中でも前記一般式(II)、(III)、及び(IV)において R^0 が $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 又は $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ であり、 $R^{1a}, R^{1b}, R^{1c}, R^{1d}, R^{1e}, R^{1f}, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{9a}$ が水素原子であり、 C^3 と C^4 の間で二重結合を形成している化合物であるジャスモン酸又はジャスモン酸メチル、ツベロン酸又はツベロン酸メチル、及びククルビン酸又はククルビン酸メチルが生産性向上に対する効果の大きさの点から特に好ましい。

【0073】これらジャスモン酸類は、合成により、又は植物からの抽出等により調製される(H. Yamane et al., Agric. Biol. Chem., 44, 2857-2864(1980))。—

14

- *【0068】(化合物M)
 【0069】
 【化16】



10

【0070】(化合物N)

【0071】

【化17】

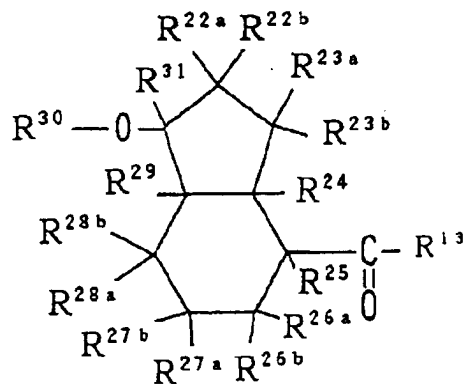
方、ジャスモン酸類は、生長促進や組織の成熟、病害抵抗性の発現にかかわる諸反応を誘起する植物ホルモン様物質として、種々の植物が自ら生産することが、吉原照彦著、植物細胞工学第2巻第4号523~531頁(1990年)に記載されている。

【0074】従って、前記ジャスモン酸類は、培養系外から添加するほかに、使用する培養細胞又は培養組織に自ら生産させることもできる。この内在性ジャスモン酸類の培養細胞又は培養組織による生産を促進する方法としては、微生物の培養物又はその抽出物、熱処理物或いは植物抽出物などの培地への添加を例示することができ、具体的にはM.J. Mueller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90(16), 7490-7494 (1993)に記載の、カビ細胞壁画分を添加する方法を例示することができる。更に、使用する培養細胞又は培養組織に、機械的に又は紫外線、熱などによって部分的に傷害を与えること

によっても、内在性ジャスモン酸の生産量を高めることが可能であり、具体的には、R.A.Cleeman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89(11), 4938-4941 (1989)に記載の、機械的に一部の細胞を破壊する方法を例示することができる。

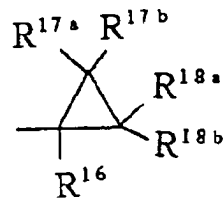
【0075】ジャスモン酸類は、水に対して難溶性のため、通常エタノール、メタノール等の有機溶媒、又は界面活性剤等に溶解した後、培地に添加する。また、遊離形のジャスモン酸類は、そのまま用いてもよいし、アルカリで中和して塩にして用いてもよい。ジャスモン酸類は、5員環カルボニル基の α 位が、酸、アルカリ、熱によってエピマー化を起こすため、不安定なシス型より安定なトランス型になりやすい。天然又は合成ジャスモン酸を用いた平衡実験では、トランス型が90%、シス型が10%の状態が存在する。一般にはシス型の方が活性が強いとされているが、本発明で使用するジャスモン酸類は、前記式 (II) (III) (IV) で示される全ての立体異性体化合物及びその混合物を包含する。

【0076】ジャスモン酸類は、培地における濃度が0.01~1000 μ Mとすることが必要であり、この中でも特にジャスモン酸類の濃度を0.1~500 μ Mの範囲に調整することが好ましい。ジャスモン酸類は、培養細胞の増殖期ないし定常期に添加することが効果的であり、この中でも特に増殖期から定常期に移行する時期にジャスモン酸類を添加することが好ましい。また、内在性ジャスモン酸類の生産量を高めるための処理の時期についてもこれと同様である。例えば、21日おきに細胞を移植している*



【0080】【式中 R^{13} は、水酸基、 OR^{14} （ここで R^{14} は、炭素数1~6のアルキル基または炭水化物残基を表す。）、 OM^1 （ここで M^1 は、アルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子または NH_4 を表す。）、または NR^{15a} R^{15b} （ここで、 R^{15a} 、 R^{15b} は、それぞれ独立して水素原子、炭素数1~6のアシル基、炭素数1~6のアルキル基、アミノ酸残基、または一般式 (VII) :

【化20】



（ここで、 R^{16} は、水素原子、水酸基、炭素数1~6のアルキル基、炭素数1~6のアルコキシ基、または、次式

$-CO-R^{19}$

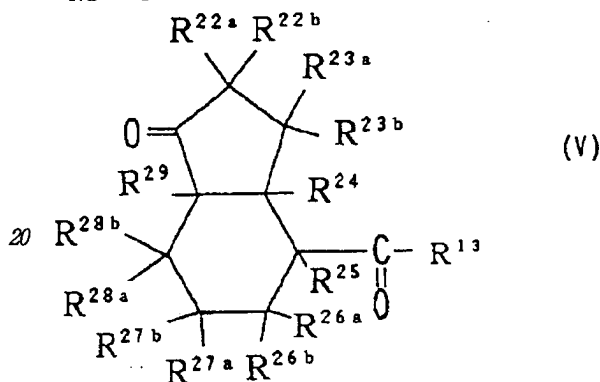
（式中 R^{19} は、水酸基、 OM^2 （ここで M^2 は、アルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子または NH_4 を表

*場合には7~16日目がジャスモン酸類の添加又は内在性ジャスモン酸類の生産量を高めるための処理の適期にあたる。また、ジャスモン酸類の添加及び内在性ジャスモン酸類の生産量を高める処理は、一度に行ってもよいし、複数回に分けて行ってもよい。

【0077】また本発明は、特願平6-301179号明細書に開示されているコロナチン類、コロナチン類産生菌、それら菌類の培養液、またはそれら菌類の培養抽出物の存在下に培養を行う方法とも併用することができる。ここで、コロナチン類化合物としては、下記的一般式 (V) :

【0078】

【化18】



または一般式 (VI) :

【0079】

【化19】

(VI)

(VII)

17

す。)、 NR^{20a} 、 R^{20b} (ここで、 R^{20a} 、 R^{20b} は、それぞれ独立して水素原子、炭素数1~6のアシル基、炭素数1~6のアルキル基、アミノ酸残基を表す。)、または OR^{21} (ここで R^{21} は、炭素数1~6のアルキル基、または炭水化物残基を表す。)を表す。)で示される基を表し; R^{17a} 、 R^{17b} 、 R^{18a} 、および R^{18b} は、それぞれ独立して水素原子、水酸基、炭素数1~6のアルキル基、または炭素数1~6のアルコキシ基を表す。)で示される基を表す。)を表し; R^{22a} 、 R^{22b} 、 R^{23a} 、 R^{23b} 、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26a} 、 R^{26b} 、 R^{27a} 、 R^{27b} 、 R^{28a} 、 R^{28b} 、 R^{29} 、および R^{31} は、水素原子、水酸基、炭素数1~6のアルキル基、または炭素数1~6のアルコキシ基を表し; R^{30} は、水素原子、炭素数1~6のアルキル基、または炭水化物残基を表し;式中の五員環および六員環は、隣接する炭素原子間で二重結合を形成してもよい。]で示される化合物等が挙げられる。

【0081】前記一般式(V)、(VI)、(VII)において、 R^{14} 、 R^{15a} 、 R^{15b} 、 R^{16} 、 R^{17a} 、 R^{17b} 、 R^{18a} 、 R^{18b} 、 R^{20a} 、 R^{20b} 、 R^{21} 、 R^{22a} 、 R^{22b} 、 R^{23a} 、 R^{23b} 、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26a} 、 R^{26b} 、 R^{27a} 、 R^{27b} 、 R^{28a} 、 R^{28b} 、 R^{29} 、 R^{30} 、 R^{31} で表される炭素数1~6のアルキル基としては、具体的にはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、ネオペンチル基、*t*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、イソヘキシル基等が挙げられる。

【0082】前記一般式(V)、(VI)、(VII)において、 R^{16} 、 R^{17a} 、 R^{17b} 、 R^{18a} 、 R^{18b} 、 R^{22a} 、 R^{22b} 、 R^{23a} 、 R^{23b} 、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26a} 、 R^{26b} 、 R^{27a} 、 R^{27b} 、 R^{28a} 、 R^{28b} 、 R^{29} 、または R^{31} で表される炭素数1~6のアルコキシ基としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、イソプロポキシ基、*n*-ブトキシ基、イソブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*t*-ブトキシ基、*n*-ペンチルオキシ基、ネオペンチルオキシ基、*t*-ペンチルオキシ基、*n*-ヘキシルオキシ基、イソヘキシルオキシ基等が挙げられる。

【0083】 R^{13} または R^{19} が OM^1 または OM^2 である場合において、 M^1 または M^2 で表されるアルカリ金属原子又はアルカリ土類金属原子としては、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム等が挙げられる。

【0084】 R^{13} または R^{19} が、 NR^{15a} 、 R^{15b} または NR^{20a} 、 R^{20b} である場合において、 R^{15a} 、 R^{15b} 、 R^{20a} 、または R^{20b} で表される炭素数1~6のアシル基は、直鎖、分岐鎖のいずれでもよく、例えばホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、バレリル基、ヘキサノイル基、アクリロイル基等が挙げられる。

【0085】 R^{13} または R^{19} が NR^{15a} 、 R^{15b} または NR^{20a} 、 R^{20b} である場合において、 R^{15a} 、 R^{15b} 、 R^{20a} 、 R^{20b} で表されるアミノ酸残基としては、例えば

18

R^{20a} 、 R^{20b} で表されるアミノ酸残基としては、例えばイソロイシル基、バリル基、グルタミル基、リジル基を例示することができる。

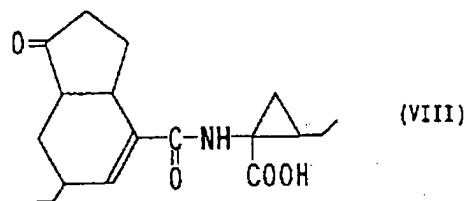
【0086】 R^{13} または R^{19} が OR^{14} または OR^{21} である場合において、 R^{14} 、 R^{21} で表される炭水化物残基としては、グルコピラノシル基が挙げられる。

【0087】前記一般式(VI)において R^{30} が炭水化物残基である場合としては、例えばグルコピラノシル基が挙げられる。

【0088】コロナチン類の好ましい化合物としては、コロナチン(式VIII)、あるいはコロナファシック酸(式IX)が挙げられる。なかでもコロナチンは、式(V)のなかでも活性がもっとも強く、その構造は、コロナファシック酸と2-エチル-1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸のエチル誘導体とがアミド結合したものである。

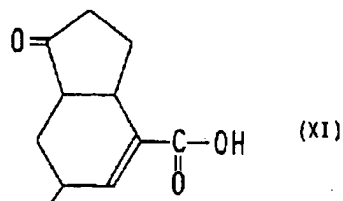
【0089】

【化21】



【0090】

【化22】



【0091】本発明で使用されるコロナチン類には種々の立体異性体(シストランズ異性体、光学異性体)が存在するが、それぞれの異性体を単独で用いても、混合物の形で用いてもよい。

【0092】コロナチン類、コロナチン類産生菌、それら菌類の培養液、またはそれら菌類の培養抽出物を培地に添加する場合は、コロナチン類の培地における濃度は通常0.001~1000 μM とすることが必要であり、特に0.01~100 μM の範囲に調整することが本発明の方法にとって好ましい。

【0093】また、本発明は、特願平6-201150号明細書に記載されている、重金属を含む化合物類、重金属イオンを含む錯イオン類、及び重金属イオンから選ばれた少なくとも一つの存在下に培養する方法との併用が挙げられる。ここで、重金属としては、銀に代表される銅族、コバルトに代表的される鉄族を使用することが好ましく、当該重金属を含む化合物、当該重金属を含む錯イオン類、又は当該金属イオンの形で使用することが

好ましい。銀を含む化合物としては、具体的には硝酸銀、硫酸銀などの銀化合物および/または $[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$ 、 $[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_3]^{5-}$ などの銀を含む錯イオンが挙げられる。また、コバルトを含む化合物としては、具体的には塩化コバルト、硝酸コバルト、硫酸コバルトなどのコバルト化合物が挙げられる。本発明において、これらの銀ないしコバルトを含む化合物を使用する際の培地中の濃度としては、 $10^{-6}\text{M}\sim 10^{-1}\text{M}$ の範囲を例示することができる。

【0094】また、本発明は、特願平6-201151号明細書に記載されている、アミン類の存在下に培養する方法との併用が挙げられる。ここでアミン類としては、ポリアミン類、具体的にはブトレッシン、カダベリン、スベルミジン、スベルミン、エチレンジアミン、N,N-ジエチル-1,3-プロパンジアミン、ジエチレントリアミン、及びこれらの化合物の塩より成る群から選ばれる少なくとも一種以上を使用することが好ましい。

【0095】また本発明は、特願平6-146826号明細書に開示されている、抗エチレン剤の存在下に培養を行う方法とも併用することができる。ここで、抗エチレン剤としては、アミノオキシ酢酸、アセチルサリチル酸、リゾビトキシン、アミノエトキシビニルグリシン、メトキシビニルグリシン、 α -アミノイソ酪酸または当該化合物類の塩、エステル、もしくはアミノ酸または炭水化物誘導体などの、植物細胞中におけるS-アデノシルメチオニンから1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸への変換を触媒する酵素の活性を阻害する化合物群、没食子酸プロピルまたは当該化合物の塩、エステル、もしくはアミノ酸または炭水化物誘導体などの、植物細胞中における1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸からエチレンへの変換を触媒する酵素の活性を阻害する化合物群、および1, 5-シクロオクタジエン、イソチアン酸化合物類、または当該化合物類の塩、エステル、もしくはアミノ酸または炭水化物誘導体などの、培養物内に貯留するか、または該培養物を含む培養器内の気相中或いは培地中に存在するエチレンを除去する物質群を例示することができる。

【0096】また本発明は、特願平6-146826号明細書に開示されている、培養器内の気相中の酸素濃度を培養初期より大気中の酸素濃度未満の条件下に制御して培養を行うか、或いは組織及び/又は細胞と接する流動性の培地中の溶存酸素濃度を培養初期よりその温度に於ける飽和溶存酸素濃度未満である条件下に制御して培養する方法とも併用することができる。

【0097】ここで、培養初期とは、培養開始時ないし培養開始後7日目をいい、培養器内の気相中の酸素濃度、又は組織及び/又は細胞と接する流動性の培地中の溶存酸素濃度の制御は、培養開始時から行うことが好ましい。また、制御の期間としては、培養全期間を通して該条件に制御してもよいし、培養全期間中の一部期間の

みを制御してもよく、特に限定するものではないが、全培養期間中の、少なくとも3日間制御することが好ましい。

【0098】培養器内の気相中の酸素濃度は、4ないし15%に制御することが必要であり、特に6ないし12%に制御することが好ましい。また、流動性の培地中の溶存酸素濃度は、その温度における飽和溶存酸素濃度値の1ないし75%に制御することが必要であり、特に10ないし75%に制御することが好ましい。

【0099】さらに本発明は、特願平5-284893に開示されている、細胞を比重の違いにより複数の層に分け、少なくとも1つの層に含まれる細胞を培養する方法とも併用することができる。

【0100】また、本発明は、特願平5-284893号、同6-104213号明細書に開示されている、細胞を比重の違いにより複数の層に分け、少なくとも1つの層に含まれる細胞を培養する方法と併用することもできる。細胞を比重によって分離する方法としては、一般に遠心分離用媒体を用いて密度勾配を作成し、細胞を重層した後、遠心分離する方法が知られている。

【0101】遠心分離用媒体としては、Ficoll、Percoll（共にPharmacia LKB Biotechnology 社製）、ショ糖、塩化セシウム等が用いられる。密度勾配を形成する層の数に特に制限はない。各層の比重差は、特に限定されるものではなく、また各比重差は同じであっても異なってもよい。従って、この密度勾配の定義には勾配が連続的に変化する場合（密度勾配を形成する層の数が無限大、各層の比重差が0に近い状態）も含む。

【0102】このようにして密度勾配を形成し、細胞を重層、遠心分離することにより細胞を比重の違いにより複数の層に分けることができる。作成する層の比重は、通常1.00~1.20g/ml、好ましくは1.03~1.11g/mlの範囲である。培養の対象となる層としては、少なくとも1つの層を選択し、また全ての層を選択して培養してもよい。

【0103】複数の層を選択して培養する場合、これらの複数の層は、それぞれ個別に培養することもできるが、選択した複数の層のうちの2層以上の層を混合して培養することもできる。タキサン型ジテルペン産生能の高い培養細胞は、通常、比重が1.07以下の層に含まれる細胞を培養して得られるが、培養する細胞や培養の条件により変動する場合があります、必ずしもこの範囲に限定されるものではない。また、単に比重の違いによって分画しただけでは、比重の高い層の細胞の方がタキサン型ジテルペン含量が高くなる傾向が認められる。従って、より確実にタキサン型ジテルペン高産生培養細胞を取得するためには、分画された全ての層の細胞を一定期間培養した後、各層の細胞に含まれるタキサン型ジテルペン濃度を測定し、それらの中からタキサン型ジテルペン高産生細胞を含む層を選択することが望ましい。

【0104】また、例えば1.07g/mlのように、ある1つの特定の比重の遠心分離媒体を作成し、前述の方法で遠心分離することによっても、培養細胞を比重の違いにより複数の層に分けることができる。

【0105】さらに本発明は、特願平6-301178号明細書に開示されている、高密度培養のために流加培養または灌流培養を実施する方法、特願平6-297610号明細書に開示されている連続培養方法および特願平6-304089号に開示されている通気ガス中の炭酸ガス濃度を高めて培養する方法とも組み合わせることが可能である。

【0106】また、本発明にかかる方法と、上述の先願特許に記載の方法を任意に組み合わせることも可能である。

【0107】以上のようにして得られた培養組織または培養細胞から、メタノール等の有機溶媒による抽出によってタキサン型ジテルペンを分離することができる。また、培地中に適当な吸着剤や有機溶媒を共存させ、培養中に連続的にタキサン型ジテルペンを回収することもできる。

【0108】本発明の組織培養の好ましい一例としては、次の方法が挙げられる。

【0109】先ずイチイ属に属する植物の植物体、例えば根、生長点、葉、茎、種子などから採取される植物片を殺菌処理後、ゲランガムで固めたウッディー・プラント・メディウムの固体培地上に置床し、10~35℃で14~60日程度経過させて組織片の一部をカルス化させる。このようにして得られたカルスを継代培養すると生育速度が漸次高まり安定化したカルスが得られる。ここで、安定化したカルスとは、培養中にカルスの一部がシュートや根に分化しないでカルスの状態を保持する性質をもち細胞の生育速度が均質であるものをいう。

【0110】この安定化したカルスを増殖に適した液体培地、例えばウッディー・プラント液体培地に移して増殖させる。液体培地においてさらに生育速度が高められる。本発明では、この安定化したカルスまたは該カルスを構成する細胞は、前記の脂肪酸および/または脂肪酸誘導体の存在下で培養される。

【0111】本発明の組織培養における培養温度としては、通常は約10~約35℃、特に約23~28℃が増殖速度が大きいので好適である。また、培養期間としては、14~42日間が好適である。

【0112】本発明の培養方法において液体培地を用いた場合には、培養終了後に培養細胞をデカンテーションまたは濾過等の方法によって培地から分離し、培養細胞および/または培地から目的とする代謝産物を有機溶媒による抽出等の方法によって分離することができる。

【0113】

【実施例】以下、実施例および比較例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例

に限定されるものではない。

【0114】【実施例1】ナフタレン酢酸を 10^{-5} Mの濃度になるように添加したウッディー・プラント固体培地（ゲランガム0.25重量%）に、前もって2%アンチホルミン溶液または70%エタノール溶液等で滅菌処理したセイヨウイチイ (*Taxus baccata* LINN) の茎の一部を置床し、25℃で暗所にて静置培養してカルスを得た。次にこのカルス1g（新鮮重）を、ウッディー・プラント液体培地20ml入りの三角フラスコに移し、ロータリーシェーカー上で旋回培養（振幅25mm、100rpm）し、21日毎に植えつぎ、該カルスの生育速度を速めた。

【0115】こうして得られた液体培養細胞2g新鮮重を、0.01~1000 μ Mの α -リノレン酸（エタノールに溶解して添加）を添加したウッディー・プラント液体培地20ml（容器：100ml三角フラスコ）に移植して、25℃、暗所下、ロータリーシェーカー上で旋回培養（振幅25mm、100rpm）した。

【0116】14日間の培養後、培養細胞を濾過により採取し、凍結乾燥した後その乾燥重量を測定し、生育倍率を求めた。得られた乾燥カルスおよび培地からメタノール等を用いてタキサン型ジテルペンを抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いて標準品タキソールと比較定量することによってタキソール収量を測定した。その結果を表1に示す。

【0117】【実施例2】実施例1において、 α -リノレン酸の代わりに、100 μ Mのオレイン酸を使用すること以外は実施例1と同様に実施した。結果を表2に示す。

【0118】【実施例3】実施例1において、 α -リノレン酸の代わりに、100 μ Mのリノール酸を使用すること以外は実施例1と同様に実施した。結果を表2に示す。

【0119】【実施例4】実施例1において、 α -リノレン酸の代わりに、100 μ Mのアラキドン酸を使用すること以外は実施例1と同様に実施した。結果を表2に示す。

【0120】【実施例5】実施例1において、 α -リノレン酸の代わりに、100mg/lのナタネ油を使用すること以外は実施例1と同様に実施した。結果を表2に示す。

【0121】【実施例6】実施例1において、植物種がタキサス・メディア (*T. media*)（カルス誘導に使用した部位：種子）であること以外は、実施例1と同様に実施した。結果を表3に示す。

【0122】【比較例1】実施例1において、 α -リノレン酸を添加しないこと以外は実施例1と同様に実施した。結果を表1に示す。

【0123】【比較例2】実施例6において、 α -リノレン酸を添加しないこと以外は、実施例6と同様に実施した。結果を表3に示す。

【0124】